

doi:10.3969/j.issn.1005-3697.2020.05.02

❖ 论著 ❖

XRCC1 及 XPD 基因多态性与高海拔地区非小细胞肺癌的关系及其对预后的意义

马吉成, 马秀红, 韩海林, 贺文财, 李叶

(青海省第五人民医院放疗一科, 青海 西宁 830000)

【摘要】目的: 探讨 XRCC1 及 XPD 基因多态性与高海拔地区非小细胞肺癌 (NSCLC) 的关系及其对预后的意义。**方法:** 选取 122 例高海拔地区非小细胞肺癌患者为研究对象。采集患者外周静脉血, 并提取血液标本基因组 DNA, 应用限制性片段长度多态性聚合酶链反应 (PCR-RFLP) 技术及基因测序法进行基因型判定。比较 XRCC1-194、XRCC1-28 及 XPD-312 位点的基因型分布频率与 NSCLC 临床特征的关系; 比较 XRCC1 及 XPD 基因多态性与患者预后的关系。**结果:** XRCC1-194、XRCC1-280、XPD-312 基因多态性在 NSCLC 不同分化程度及临床分期中, 差异均有统计学意义 ($P < 0.05$); XRCC1-194 位点 CC、CT、TT 基因型生存曲线无明显差异 ($P > 0.05$), XRCC1-280 位点 AA、GG 基因型和 XPD-312 位点 AA、GA、GG 位点基因型生存曲线差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。**结论:** XRCC1 及 XPD 基因是修复损伤基因, XRCC1-194、XRCC1-280 及 XPD-312 位点不同基因型与高海拔地区 NSCLC 患者的临床特征有着密切关系, 其中 XRCC1-280 及 XPD-312 位点不同基因型可作为判断患者预后的标志物。

【关键词】 高海拔地区; 非小细胞肺癌; XRCC1; XPD; 预后

【中图分类号】 R734.2 **【文献标志码】** A

Relationship between XRCC1 and XPD gene polymorphisms and non-small cell lung cancer in high altitude area and its significance for prognosis

MA Ji-cheng, MA Xiu-hong, HAN Hai-lin, HE Wen-cai, LI Ye

(Department of Radiotherapy I, the Fifth People's Hospital, Xining 830000, Qinghai, China)

【Abstract】Objective: To explore the relationship between XRCC1 and XPD gene polymorphism and non-small cell lung cancer (NSCLC) in high altitude area and its significance for prognosis. **Methods:** 122 cases of NSCLC in high altitude areas were selected as the study objects. The peripheral venous blood of patients was collected, and the genomic DNA of blood samples was extracted. The genotypes were determined by PCR-RFLP and gene sequencing. The genotype frequencies of XRCC1-194, XRCC1-280 and XPD-312 were compared with the clinical characteristics of NSCLC. The relationship between XRCC1 and XPD gene polymorphism and prognosis was compared. **Results:** The XRCC1-194, XRCC1-280, XPD-312 gene polymorphism and NSCLC differentiation degree, and clinical stage were statistically significant ($P < 0.05$). There was no significant difference in survival curves of CC, CT and TT genotypes at XRCC1-194 locus ($P > 0.05$). There were significant differences in survival curves of AA, GG genotypes at XRCC1-280 and AA, GA, GG genotypes at XPD-312 ($P < 0.05$). **Conclusion:** XRCC1 and XPD genes are repair damage genes. Different genotypes of XRCC1-194, XRCC1-280 and XPD-312 loci are closely related to the clinical characteristics of NSCLC patients in high altitude areas, and different genotypes of XRCC1-280 and XPD-312 loci can be used as markers to judge the prognosis of patients.

【Key words】 High altitude areas; Non-small cell lung cancer; XRCC1; XPD; Prognosis

肺癌是临床最常见的恶性肿瘤, 其发病及死亡率均居恶性肿瘤的首位; 随着我国经济的发展, 肺癌的发病率在逐年增加, 给我国居民的生命健康带来严重威胁^[1-2]。肺癌多数为非小细胞肺癌 (non-

small cell lung cancer, NSCLC) 早期临床症状不典型, 一旦确诊患者则处于中晚期, 错过最佳治疗时机, 患者预后较差^[3-4]。DNA 受各种因素影响会产生不同的损伤, 若未能及时修复这种损伤, 积累到一

定程度会引发癌变^[5]。DNA 损伤修复基因主要包括人类着色性干皮病基因 D(XPD)及修复交叉互补基因 1(XRCC1)等,这些基因多态性是 NSCLC 发生的遗传基础,在 NSCLC 的发生及发展过程中起重要作用^[6]。XRCC1-194、XRCC1-280、XPD-312 的单核苷酸多态性(single nucleotide polymorphism, SNP)位点较多,本研究通过对 XRCC1-194、XRCC1-280、XPD-312 较常见的几个位点进行检测,探讨这些基因多态性与 NSCLC 发病及预后的关系,以期对 NSCLC 的治疗及预后预测提供科学依据。

1 资料与方法

1.1 一般资料

选取 2012 年 10 月至 2014 年 9 月,青海省第五人民医院收治的 122 例 NSCLC 患者为研究对象,纳入标准:(1)经 CT 及病理学检查确诊为 NSCLC^[7],且临床分期为 III B 与 IV 期患者;(2)预计生存期 >3 个月;(3)既往未行手术、化疗及放疗;(4)签署同意知情书。其中男性 91 例,女性 31 例;患者年龄 30~79 岁,平均(58.47±8.75)岁;鳞癌 65 例,腺癌 57 例;III B 期 39 例,IV 期 83 例。本研究经过伦理委员会审查批准,所有纳入研究的对象均未发生失访情况。

1.2 实验仪器及试剂

离心机(美国 Eppendorf 公司,5424r)、遗传分析仪(美国 ABI 公司,ABI 3500XL)、核酸蛋白分析仪(美国 Nanodrop 公司,NanoDrop 2000C)、电泳仪(美国 Bio-Rad 公司);DNA 提取试剂盒由美国 Promega 公司提供,测序反应试剂由美国 ABI 公司提供,PCR 反应试剂盒由美国 Invitrogen 公司提供,引物由上海博亚生物技术有限公司提供。

1.3 方法

采集研究对象(禁食 8 h)的外周静脉血 3 mL,置入抗凝管中,编号后,置入 -20 °C 冰箱备存待测。XRCC1 及 XPD 基因多态性检测:(1)基因组 DNA 提取:按照 DNA 抽提试剂盒说明书操作抽提血液基因组 DNA,纯度为 1.8 左右;(2)引物设计:引物序列见表 1;(3)PCR 扩增:XRCC1-194 位点基因条件为:95 °C 变性 5 min,94 °C 30 s,57 °C 退火 30 s,72 °C 45 s,35 个循环,72 °C 延伸 10 min;XRCC1-280 位点基因扩增条件为:95 °C 变性 5 min,94 °C 30 s,59 °C 退火 30 s,72 °C 45 s,35 个循环,72 °C 延伸 10 min;XPD-312 位点基因条件为:95 °C 变性 5 min,94 °C 30 s,62 °C 退火 30 s,72 °C 45 s,35 个循环,72 °C 延伸 7 min;(4)测序:将 PCR 产物电泳后,取 PCR 产物 1 μL,加入 2 μL SAP MIX 混匀,PCR 仪酶解;

测序试剂、测序引物及 PCR 酶解产物在 PCR 仪上进行测序 PCR 扩增反应,将测序扩增产物通过加入醋酸钠-乙醇混合物、70% 乙醇进行离心去上清,再加入 DNA 溶解液对 DNA 溶解,得到纯化产物,在 DNA 测序仪上进行电泳。

表 1 XRCC1 及 XPD 基因引物列表

位点	序列	长度(bp)
XRCC1-194	Forward:5'-CTGACCTTGGGGACCTTA-3'	455
	Reverse:5'-GTCGCTGGCTGTGACTATG-3'	
XRCC1-280	Forward:5'-CCCCAGTGGTCTAACCTAA-3'	304
	Reverse:5'-CTACATGAGCTGCCTGCTGT-3'	
XPD-312	Forward:5'-CTGTGCTGGGTGCCCTATCTGTGCTCT-3'	751
	Reverse:5'-TAATATCGGGGCTCACCTGCAGCACTTCCT-3'	

1.4 统计学分析

采用 SPSS 19.0 软件处理数据。计数资料采用 $[n(\%)]$ 进行描述,采用 χ^2 检验,生存分析用 Kaplan-Meier 进行分析,并采用多因素 COX 回归进行分析。 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 NSCLC 患者 XRCC1 及 XPD 基因型分布频率

XRCC1-194 位点 CC、CT、TT, XRCC1-280 位点 AA、GG 基因型和 XPD-312 位点 AA、GA、GG 位点基因型在 NSCLC 中的分布频率。见表 2。

表 2 XRCC1 及 XPD 基因型分布频率 $[n(\%)]$

XRCC1-194	分布频率	XRCC1-280	分布频率	XPD-312	分布频率
CC	65(53.28)	AA	25(20.49)	AA	22(18.03)
CT	9(7.38)			GA	10(8.20)
TT	48(39.34)	GG	97(79.51)	GG	90(73.77)

2.2 XRCC1-194、XRCC1-280 和 XPD-312 基因多态性与 NSCLC 临床特征关系

XRCC1-194、XRCC1-280、XPD-312 基因多态性在 NSCLC 不同分化程度及临床分期中,差异均有统计学意义($P < 0.05$),在不同年龄、性别和病理类型中,差异均无统计学意义($P > 0.05$)。见表 3-表 5。

2.3 XRCC1-194、XRCC1-280 和 XPD-312 基因多态性患者生存情况

XRCC1-194 位点 CC、CT、TT 基因型生存曲线比较,差异无统计学意义($P > 0.05$),XRCC1-280 位点 AA、GG 基因型和 XPD-312 位点 AA、GA、GG 位点基因型生存曲线比较,差异有统计学意义($P < 0.05$)。见表 6、表 7 及图 1-图 3。

表 3 XRCC1-194 与 NSCLC 临床特征关系 [n(%)]

临床特征	XRCC1-194			χ^2 值	P 值
	CC	CT	TT		
年龄(岁)				0.250	0.993
<35	8(53.33)	1(6.67)	6(40.00)		
35~59	38(52.78)	6(8.33)	28(38.89)		
≥60	19(54.29)	2(5.71)	14(40.00)		
性别				0.141	0.932
男	49(53.85)	7(7.69)	35(38.46)		
女	16(44.44)	2(6.45)	13(41.94)		
分化程度				18.730	0.001
高分化	9(42.86)	1(4.67)	11(52.38)		
中分化	20(41.67)	1(2.08)	27(56.25)		
低分化	36(67.92)	7(13.21)	10(18.87)		
临床分期				7.659	0.022
ⅢB	16(41.03)	1(2.56)	22(56.41)		
Ⅳ	49(59.04)	8(9.64)	26(31.33)		
病理类型				2.961	0.228
腺癌	33(57.89)	2(3.51)	22(38.60)		
鳞癌	30(46.15)	7(10.77)	26(40.00)		

表 4 XRCC1-280 与 NSCLC 临床特征关系 [n(%)]

临床特征	XRCC1-280		χ^2 值	P 值
	AA	GG		
年龄(岁)			3.330	0.189
<35	4(26.67)	11(73.33)		
35~59	15(20.83)	57(79.17)		
≥60	6(17.14)	29(82.86)		
性别			1.224	0.269
男	16(17.58)	75(82.42)		
女	9(29.03)	22(70.97)		
分化程度			49.024	<0.001
高分化	16(76.19)	5(23.81)		
中分化	6(12.50)	42(87.50)		
低分化	3(5.66)	50(94.34)		
临床分期			48.691	<0.001
ⅢB	23(58.97)	16(41.03)		
Ⅳ	2(2.41)	81(97.59)		
病理类型			2.044	0.153
腺癌	8(14.04)	49(85.96)		
鳞癌	17(26.15)	48(73.85)		

表 5 XPD-312 与 NSCLC 临床特征关系 [n(%)]

临床特征	XPD-312			χ^2 值	P 值
	AA(20)	GA(10)	GG(90)		
年龄(岁)				0.543	0.969
<35	2(13.33)	1(6.67)	12(80.00)		
35~59	11(15.28)	6(8.33)	53(73.61)		
≥60	7(20.00)	3(8.57)	25(71.43)		
性别				0.710	0.701
男	16(17.58)	8(8.79)	65(71.43)		
女	4(12.90)	2(6.45)	25(80.65)		
分化程度				32.090	<0.001
高分化	2(9.52)	8(4.67)	11(52.93)		
中分化	6(12.50)	1(2.08)	41(85.42)		
低分化	12(22.64)	1(1.89)	40(75.47)		
临床分期				18.120	<0.001
ⅢB	5(12.82)	9(23.08)	25(64.10)		
Ⅳ	15(18.07)	1(1.20)	65(78.31)		
病理类型				2.177	0.337
腺癌	8(14.04)	3(5.26)	47(82.46)		
鳞癌	12(18.46)	7(10.77)	43(66.15)		

表 6 患者生存时间影响因素的单因素分析

类型	平均生存时间(95% CI)	χ^2 值	P 值
XRCC1-194		0.168	0.814
CC	26.26(22.96~31.55)		
CT	16.53(12.47~21.55)		
TT	31.89(24.41~39.98)		
XRCC1-280		4.973	0.027
AA	30.58(23.82~39.56)		
GG	20.43(13.87~28.83)		
XPD-312		5.224	0.013
AA	18.68(12.92~24.13)		
GA	32.14(24.58~41.36)		
GG	20.25(13.85~29.53)		

表 7 患者生存时间影响因素的多因素分析

参数	B 值	SE 值	HR 值	95% CI	P 值
XRCC1-194(CC,CT,TT)	0.567	0.318	0.573	0.308~0.947	0.083
XRCC1-280(AA,GG)	0.653	0.356	0.563	0.325~0.912	0.012
XPD-312(AA,GA,GG)	0.589	0.389	0.582	0.362~0.984	0.005

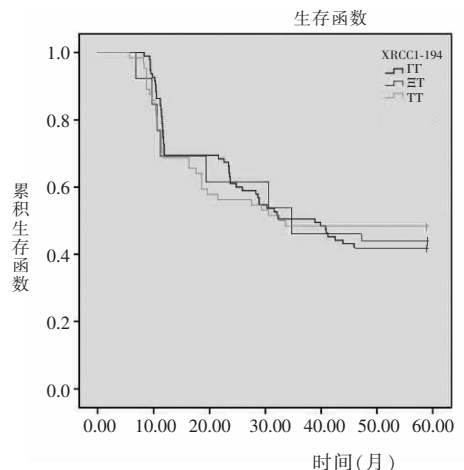


图 1 XRCC1-194 NSCLC 患者生存曲线

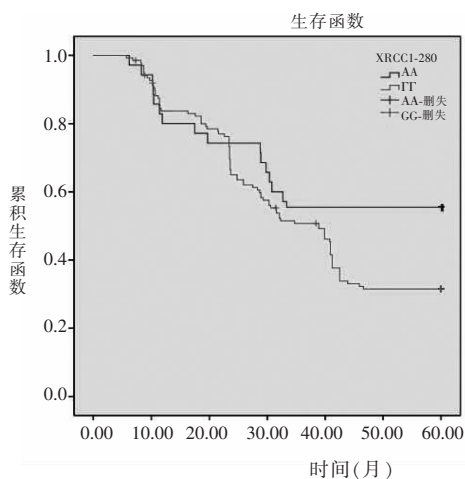


图2 XRCC1-280 NSCLC 患者生存曲线

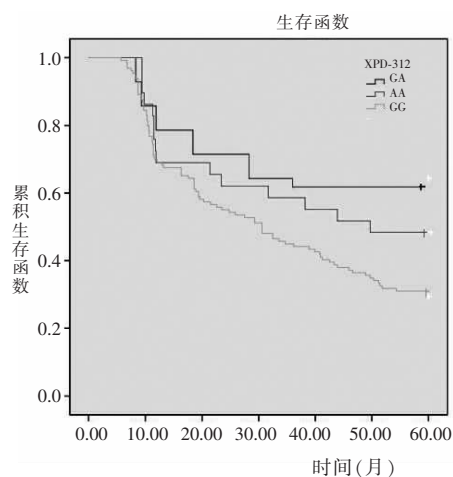


图3 XPD-312 NSCLC 患者生存曲线

3 讨论

肺癌是一种起源于支气管黏膜上皮的恶性肿瘤^[8]。目前 NSCLC 的发病机制尚未完全清楚,通常认为在致癌因子包括吸烟、电离辐射、遗传及基因改变等影响下,其入侵导致肺部局部细胞受损,会引起微环境变化,进而发生细胞恶性增殖,最终导致癌变^[9-10]。NSCLC 的发生、发展是一个长期多步骤的过程,不同患者对外界影响因素反应不同,这种差异主要由遗传因素决定,即 SNP 导致其易感性不同^[11-12]。因此了解不同 NSCLC 基因分型与临床预后的关系,对 NSCLC 的诊治具有十分重要的意义。

为了稳定基因组的稳定性和完整性,机体产生了 DNA 损伤修复体系,而普通的 DNA 修复基因多态性可能会改变个体对 DNA 损伤的修复能力,从而导致基因组的不稳定性,并增加肿瘤的发生风险^[13-14]。基因多态性可通过影响细胞因子分子的构成及蛋白的表达,对细胞免疫及生长进行调节,从而表现为不同的临床特征,并可影响 NSCLC 患者的预后^[15]。基因多态性大致分为三类:SNP、DNA 片

段长度多态性及 DNA 重复序列多态性,其中 SNP 是引起基因变异的主要原因,可导致不同个体的修复能力存在差异,并加快肿瘤的恶变^[16-17]。机体在外界各种不良因素影响会出现 DNA 蛋白质交联、DNA 单链及双链断裂及碱基错配等损伤,DNA 损伤修复系统会对这些损伤进行自我修复,确保个体的基因遗传信息的稳定性,这些修复基因包括 XRCC1、XPD、hMSH2、hOGG1、XRCC3 等^[18-19]。

DNA 损伤修复系统的修复途径主要为核苷酸和碱基切除修复,XRCC1 基因是碱基切除修复系统的重要成分,有 60 个 SNP 位点,其可在 DNA 损伤修复及 DNA 转录的调节中起到重要作用^[20-21]。本研究结果显示,携带 XRCC1-194 等位基因 CC、XRCC1-280 GG 基因型在低分化、IV 期 NSCLC 患者中分布较多;XRCC1-194、XRCC1-280 基因多态性与 NSCLC 的分化程度、临床分期均有统计学意义($P < 0.05$)。本研究中 XRCC1-280 只检测到 AA 和 GG 纯合基因型,而无 AG 杂合型,这可能受取样例数有限影响,存在一定的偏倚。以上区域发生基因突变后,XRCC1 的蛋白功能发生改变,对转录因子 SP 的结合产生破坏作用,使 XRCC1 基因转录水平下降,并引起聚合酶 III 功能降低,进而修复能力下降,与 NSCLC 的进展有密切关系。

XPD 基因是 DNA 修复基因的一种,有 6 个 SNP 位点,其蛋白产物参与 II 型转录因子 H 复合物,参与基础转录,是 DNA 解链及启动位点所必需的解链酶,并可参与核苷酸切除修复^[22]。XPD 基因 SNP 单个碱基的突变会引起蛋白功能的改变,从而导致肿瘤的癌变。本研究结果显示,XPD-312 AA 和 GG 基因型在低分化、IV 期 NSCLC 患者中分布较多,XPD-312 基因多态性在 NSCLC 的不同分化程度和临床分期中,差异均有统计学意义($P < 0.05$),这意味着 XPD-312 可能通过改变基因的修复能力,进而对 NSCLC 患者早期临床特征产生影响,并促进 NSCLC 的进展。

本研究结果显示,XRCC1-194 CC、CT、TT 基因型生存曲线比较,差异无统计学意义($P > 0.05$);XRCC1-280 AA、GG 基因型和 XPD-312 AA、GA、GG 基因型生存曲线比较,差异有统计学意义($P < 0.05$)。说明 NSCLC 预后不良与 XRCC1-280 和 XPD-312 可能存在一定的关系。因此推测,XRCC1-280 和 XPD-312 等位基因可能在 NSCLC 发展进程中起到促进肿瘤发展的作用,缩短复发转移的时间,进而影响患者整体生存,可作为预测肝癌预后的重要参考指标。

综上所述,XRCC1 及 XPD 基因多态性与高海

拔地区 NSCLC 患者存在密切关系,可作为预后的标志物。本研究受样本量较小所限,难免存在偏倚影响,后续仍需扩大样本量及范围做进一步的深入研究。

参考文献

[1] Antonia SJ, Villegas A, Daniel D, *et al.* Durvalumab after Chemoradiotherapy in Stage III Non-Small-Cell Lung Cancer[J]. *N Engl J Med*, 2017, 377(20):1919-1929.

[2] 赵夏, 黄云, 唐波, 等. 胸壁切除术对非小细胞肺癌患者肺功能与生活质量的影响[J]. *疑难病杂志*, 2018, 17(3):230-234.

[3] Hendry S, Salgado R, Gevaert T, *et al.* Assessing tumor infiltrating lymphocytes in solid tumors: a practical review for pathologists and proposal for a standardized method from the International Immunology Biomarkers Working Group: Part 2: TILs in melanoma, gastrointestinal tract carcinomas, non-small cell lung carcinoma and mesothelioma, endometrial and ovarian carcinomas, squamous cell carcinoma of the head and neck, genitourinary carcinomas, and primary brain tumors[J]. *Advances in anatomic pathology*, 2017, 24(6):311.

[4] Tong JH, Yeung SF, Chan AWH, *et al.* MET amplification and exon 14 splice site mutation define unique molecular subgroups of non-small cell lung carcinoma with poor prognosis[J]. *Clinical Cancer Research*, 2016, 22(12):3048-3056.

[5] 庄顺红, 胡慧仙, 章敬成. 高表达 DNA 修复因子 BRCA2 与弥漫大 B 细胞淋巴瘤表皮生长因子抑制剂耐药间的关系[J]. *中华全科医学*, 2018, 16(1):103-106.

[6] 王娟, 厉善波. XRCC1, GSTM1 基因多态性与肺癌易感性的相关性[J]. *中国老年学杂志*, 2016, 36(24):6163-6164.

[7] 张红娟, 武志峰, 鄂林宁, 等. CT 纹理分析鉴别不可手术切除的小细胞肺癌与非小细胞肺癌中的价值[J]. *中国医学影像学杂志*, 2019, 27(11):820-823.

[8] Benavi R, Farhi R, Bennun A, *et al.* Establishment of adoptive cell therapy with tumor infiltrating lymphocytes for non-small cell lung cancer patients[J]. *Cancer Immunology, Immunotherapy*, 2018, 67(8):1221-1230.

[9] 徐世林, 卢冰, 苏胜发, 等. IV 期非小细胞肺癌化疗同期胸部三维适形放疗基于常规血液学指标建立的预后评分模型探讨[J]. *川北医学院学报*, 2019, 34(4):329-334.

[10] 吴九洲, 王永勇, 戴磊, 等. Smac 类似物 LCL161 对非小细胞肺癌 A549 细胞增殖及凋亡的影响及其机制[J]. *广西医学*,

2018, 40(5):537-540.

[11] 王小卫, 陈建华, 邓红玉, 等. XRCC1 核苷酸多态性与铂类药物化疗对肺癌患者外周血细胞参数影响的相关性分析[J]. *实用预防医学*, 2016, 23(11):1306-1309.

[12] 李志华, 王玉琢, 刘佳, 等. DNA 损伤相关遗传变异与中国人肺癌易感性的关联研究[J]. *中华预防医学杂志*, 2016, 50(8):721-727.

[13] 罗婧, 赵路军, 刘宁波, 等. 聚腺苷二磷酸核糖聚合酶抑制剂联合放疗研究进展[J]. *中华放射肿瘤学杂志*, 2016, 25(7):782-786.

[14] 淳彩璞, 朱劲松, 连文勇, 等. ERCC1 和 XRCC1 基因多态性与食管鳞癌发病及接受三维适形放疗疗效的关系[J]. *临床肿瘤学杂志*, 2015, 10(10):894.

[15] 张鑫, 林勇, 何斐, 等. IKBKAP 基因多态性与原发性肺癌易感性的病例对照研究[J]. *中华疾病控制杂志*, 2017, 21(2):136-140.

[16] 孟玲利, 李晶, 王艳娜, 等. RRM1 核苷酸多态性与非小细胞肺癌患者对吉西他滨化疗敏感性的相关性研究[J]. *中国药房*, 2017, 28(35):4897-4901.

[17] Liu W, Xiao Z, Bao X, *et al.* Identifying litchi (*Litchi chinensis* Sonn.) cultivars and their genetic relationships using single nucleotide polymorphism (SNP) markers[J]. *PLoS One*, 2015, 10(8):e0135390.

[18] Hoch NC, Hanzlikova H, Rulten SL, *et al.* XRCC1 mutation is associated with PARP1 hyperactivation and cerebellar ataxia[J]. *Nature*, 2017, 541(7635):87.

[19] Rinck-Junior JA, Torricelli C, Gomez GVB, *et al.* Influence of functional variants Asp312Asn and Lys751Gln of Xeroderma Pigmentosum Group D (XPD) and Glutathione S-transferase Mu 1 (GSTM1) and Theta 1 (GSTT1) genes on cutaneous melanoma susceptibility and prognosis[J]. *Experimental dermatology*, 2019, 28(5):631-635.

[20] Breslin C, Hornyak P, Ridley A, *et al.* The XRCC1 phosphate-binding pocket binds poly (ADP-ribose) and is required for XRCC1 function[J]. *Nucleic acids research*, 2015, 43(14):6934-6944.

[21] Mani RS, Mermershtain I, Abdou I, *et al.* Domain analysis of PNKP-XRCC1 interactions; Influence of genetic variants of XRCC1[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2019, 294(2):520-530.

[22] Avcı H, Iplik ES, Aydemir L, *et al.* Are XPD and XPG gene variants related to the mechanism of oral squamous cell carcinoma? [J]. *Cellular and molecular biology (Noisy-le-Grand, France)*, 2018, 64(15):94-99.

(收稿日期:2020-04-21)

学术编辑:谭榜尧)